

乙型肝炎病毒进入肝细胞机制研究进展*

王学军 王升启**

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染早期进入肝细胞机制研究一直是 HBV 研究领域的热点和难点。简单易得的 HBV 体外感染细胞模型是 HBV 感染进入机制研究无法逾越的主要障碍。近年来, 随着新型 HBV 体外感染细胞模型的建立和应用(HepRG 细胞和树鼯原代肝细胞), HBV 的进入机制研究取得了一系列重大发现。综述了近几年 HBV 进入肝细胞机制的最新研究进展, 主要包括 HBV 表面蛋白进入相关结构域的鉴定, 已发现的候选 HBV 进入相关分子和尚待解决的问题。

关键词 乙型肝炎病毒, 进入, 表面蛋白, 结构域, 受体
学科分类号 Q939.47, R512.62

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00630

中国是乙型肝炎病毒感染的多发区和高发区, 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是引起急性慢性肝炎、肝硬化、肝癌的重要诱因之一。HBV 属嗜肝 DNA 病毒科, 是已知感染人类最小的 DNA 病毒, 基因组大小仅 3.2 kb 左右。目前, 对 HBV 的基因组成、复制、包装、分泌等过程了解得较清楚, 但由于缺乏简单易得的 HBV 体外感染细胞模型, HBV 感染的早期机制如 HBV 的黏附、胞吞、脱壳等过程尚未得到阐明。

病毒感染细胞的第一步是与暴露于细胞表面的特定结构相结合, 很多时候这种结合亲和力较低并具有可逆性, 随后病毒识别到更特异、结合力更高的分子, 这些分子介导了病毒随后的进入过程, 人们把这种分子称之为病毒的受体。HBV 属包膜病毒, 它的进入过程是 HBV 表面蛋白与 HBV 受体等宿主分子的互作过程。近年来, 依赖于新型 HBV 体外感染细胞模型的建立, 如 HepRG 细胞和树鼯原代肝细胞(primary tupaia hepatocytes, PTH), HBV 进入肝细胞的机制得到了进一步的阐明: HBV 表面蛋白多个结构域在 HBV 进入过程中的作用得到确认, 发现了以硫酸乙酰肝素蛋白聚糖为代表的多个 HBV 候选进入相关分子。本文就近几年 HBV 感染早期进入肝细胞机制的最新研究进展作一综述, 并对尚未解决的问题提出展望。

1 HBV 体外感染细胞模型的建立

病毒进入机制的深入研究离不开简单易得的体

外感染细胞模型。长期以来, 由于缺乏合适的体外感染细胞模型, HBV 进入机制的研究进展缓慢。

除少量报道外^[1,2], 大量研究证实 HBV 无法感染肝脏来源的实验室连续培养细胞系, 如 HepG2、HuH7 等。原代成人肝细胞(primary human hepatocytes, PHH)来源有限, 并且其对 HBV 的易感性会因供者的身体状况以及分离制备方法的差异而有很大不同, 这极大地限制了 PHH 细胞的广泛应用。另外, 虽然黑猩猩对 HBV 易感, 但因其数量有限、价格昂贵和伦理等原因, 通过分离黑猩猩的原代肝细胞所建立的体外感染细胞模型应用较少。2002 年, 法国和德国科学家从一例丙肝病人身上分离得到一株肝细胞系并命名为 HepRG, 发现当 HepRG 细胞在肾上腺皮质激素和 DMSO 连续诱导两周以上时获得了对 HBV 的易感性^[3]。HepRG 细胞系的建立为 HBV 进入机制的研究揭开了新的篇章, 但其培养条件苛刻, 对血清要求很高, 且感染效率偏低, 目前仅应用于德国和法国少数实验室(个人交流)。

除人和黑猩猩外, 树鼯是唯一证实可以被 HBV 感染的小型动物。树鼯属哺乳纲, 在分类地

* 国家自然科学基金重点项目(30530650), 国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB522902)和国家杰出青年基金资助项目(30625041)。

** 通讯联系人。

Tel/Fax: 010-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-09-10, 接受日期: 2008-10-24

位上界于原始食虫类与原始灵长类之间, 进化程度较高, 新陈代谢和解剖学比犬、鼠等动物更接近于人类, 在医学研究上很有应用前景, 受到广大科学工作者的重视. 我国学者早在 20 世纪 80 年代初就对树鼩的 HBV 易感性进行了初步试验^[4], 1996 年, Walter 等^[5]的研究结果对树鼩的 HBV 易感性作了进一步的支持. 树鼩原代肝细胞体外 HBV 感染最初报道感染效率很低, 后经研究人员对 HBV 病毒适当纯化处理后, 感染率显著提高^[6], 使 PTH 作为 HBV 的体外易感靶细胞具有了实际应用价值.

为了研究 HBV 感染进入的机制, 体外感染模型所接种病毒一般采用了 HBV 病毒本身或者是 HBV 的卫星病毒——丁型肝炎病毒(hepatitis delta virus, HDV), HDV 包装利用了 HBV 的表面蛋白, 这样就使得 HBV 和 HDV 两种病毒表面的包膜蛋白种类相同, 因此, 一般认为两者采用了相同或相似的感染进入机制^[7]. 除此之外有文章报道, HBV 表面蛋白(HBsAgs)在 293T 细胞中过表达时可少量分布于细胞膜, 从而可以与逆转录病毒包装形成假病毒, 研究者根据这一特点将 HBsAgs 与慢病毒载体共转染 293T 细胞成功包装了 HBV 假病毒, 并证明此种假病毒具有与 HBV 感染相似的种属和组织特异性^[8]. HBV 表面蛋白逆转录病毒的包装成功, 为研究 HBV 表面蛋白进入相关结构域带来了

新方法.

综上所述, 现有 HBV 体外感染细胞模型所采用的细胞主要包括 PHH、PTH 和 HepRG 细胞, 接种的病毒除采用 HBV 本身外, 还可采用 HDV 或 HBV 包膜蛋白包装的假病毒(图 1).

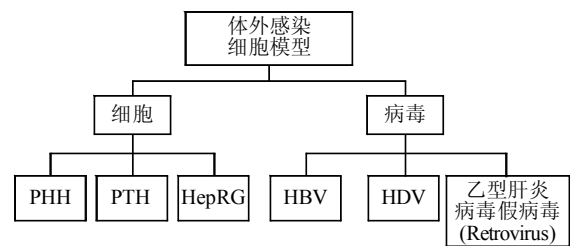


Fig. 1 Hepatitis B virus *in vitro* infection cell models
图 1 乙型肝炎病毒体外感染细胞模型

2 HBV 表面蛋白进入相关结构域的鉴定

2.1 HBV 表面蛋白组成与结构

HBV 表面蛋白分为三种: 大表面蛋白(large hepatitis B surface protein, LHBs)、中表面蛋白(middle hepatitis B surface protein, MHBs)和小表面蛋白(small hepatitis B surface protein, SHBs)(图 2). 它们由共同的开放阅读框不同的翻译起始位点翻译而得.

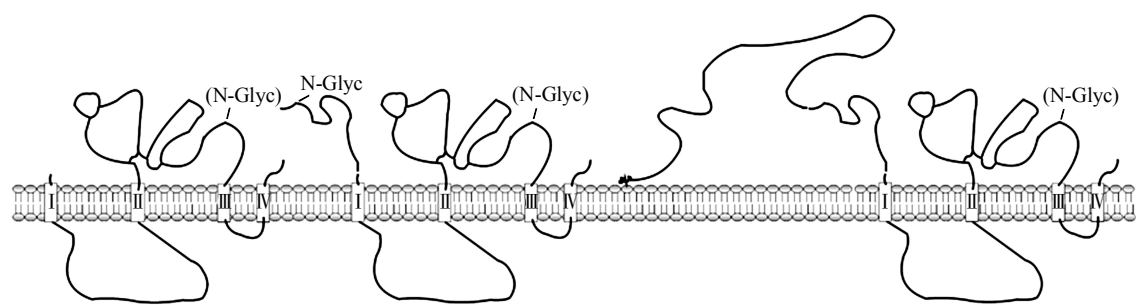


Fig. 2 The proposed structures of hepatitis B virus three surface proteins
图 2 乙型肝炎病毒 3 种表面蛋白的推测结构

SHBs 由 226 个氨基酸组成, MHBs 在 SHBs 的 N 端多出 55 个氨基酸(preS2), LHBs 在 MHBs 的 N 端又多出 108 或 119 个氨基酸(preS1). 其中, LHBs 蛋白 N 端存在豆蔻酰化位点, 大约 90% 的 MHBs 蛋白 N 端被乙酰化修饰^[9]. 此外, 三种蛋白质在 SHBs 结构域 Asn146 位点均存在 N-糖基化修饰, 但此位点三种蛋白质的糖基化效率差别很大,

其中 LHBs 在此位点糖基化率最高, 大约占到 90%, MHBs 最低, 此位点糖基化率只有 30%, SHBs 居中, 大约有 50% 的 SHBs 蛋白此位点被 N-糖基化修饰^[10]. 另外有证据证实, 在 HBV 病毒颗粒表面 LHBs 存在两种构象, 大约有一半的 preS (preS1+preS2)结构域位于病毒包膜内, 另外一半裸露于病毒表面(图 3).

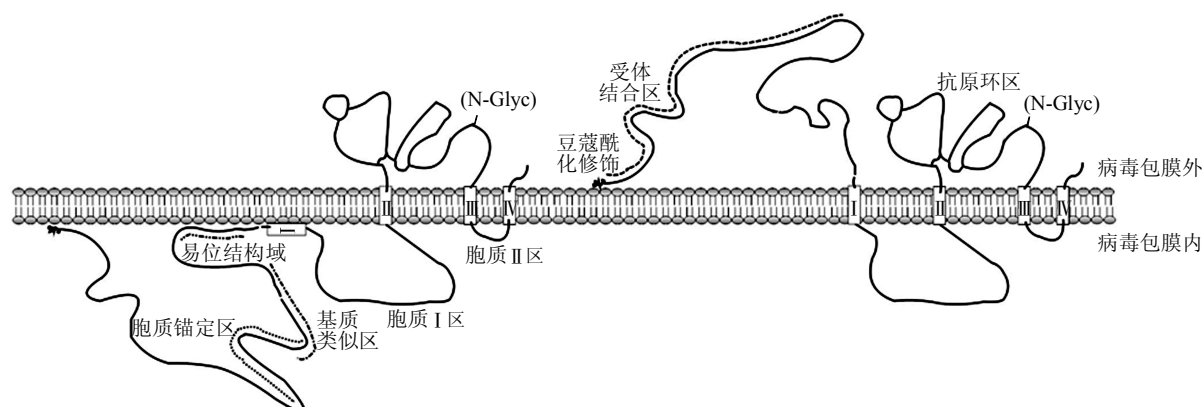


Fig. 3 The domains of hepatitis B virus large surface protein

图3 乙型肝炎病毒大表面蛋白结构域

2.2 HBV 表面蛋白进入相关结构域

目前, 对 HBV 表面蛋白进入相关结构域的鉴定所采用的病毒主要基于 HBV 本身和其卫星病毒 HDV, 感染靶细胞则主要采用了 PTH 和 HepRG 两种细胞. 研究表明, HBV 三种表面蛋白中 MHBs 对 HBV 的感染进入是不必要的^[11], LHBs 对 HBV 的感染进入则起着最关键性的作用, SHBs 因对 HBV 和 HDV 的包装分泌均不可或缺, 因此, 采用 HBV 或 HDV 病毒对其在 HBV 感染进入过程中的作用进行研究受到了极大的限制, 其具体作用尚不明确.

2.2.1 preS1 结构域. 基于以上认识, 研究人员重点对 LHBs 的 preS1 结构域进行了深入细致的研究. 研究发现, preS1 结构域是 HBV 感染主要决定结构域, 并且是 HBV 感染种属特异性决定区. 利用已有的体外感染模型, 基本上确定了 preS1 的 N 端氨基酸, 又称受体结合区(receptor binding domain, RBD)对 HBV 的感染是必不可少的^[7], preS1 结构域 C 端的胞质锚定区(cytoplasmic anchorage domain, CAD)和基质类似区(matrix-like domain, MLD)则对 HBV 的感染可有可无^[12]. 另外, preS1 结构域的一个重要特点是在 Gly-2 存在豆蔻酰化修饰, 众多证据证明, 此修饰对 HBV/HDV 的感染是必不可少的, 将此豆蔻酰化修饰转移到 MHBs 或 SHBs 并不能使 HDV 获得感染性, 这可能揭示, Gly-2 的豆蔻酰残基和其存在的 preS1 结构域 N 端共同组成了受体结合区或者两者在空间位置或构象形成上严重依赖^[13], 但其在 HBV 感染进入过程中所起的具体作用尚不清楚.

2.2.2 preS2 结构域. MHBs 和 LHBs 两种表面蛋白均存在 preS2 结构域, 两者的主要区别是前者

preS2 结构域 N 端的 Asn-4 是糖基化的而后者未经糖基化. 研究发现, 识别未糖基化 preS2 的抗体对 HBV 感染的中和作用要比识别糖基化 preS2 的抗体(Q19/10)强大得多, 因此, 虽然 MHBs 对于 HBV 的进入是不必要的^[14], 但考虑到 MHBs 和 LHBs 两种包膜蛋白 preS2 结构域 N 端结构的不同以及 LHBs 的整体结构, preS2 在 HBV 感染进入过程中的作用尚存在争议. 不过可以明确的是, 曾经被怀疑参与 HBV 进入过程的易位结构域(translocation motif, TLM)^[12, 14, 15]和大部分的 preS2 结构^[16](位于 preS2 C 端)对 HBV 的进入是不必要的, 同时也有文献报道 HDV 的感染进入不依赖于 preS2 的 N 端结构^[12]. 但对 preS2 结构域 N 端和 C 端的研究均是分开考察的, 尚没有对 preS2 整体缺失的病毒感染性进行过研究. 另外, 除基因型 A 外, HBV 的 LHBs 和 MHBs 的 preS2 结构域均存在 O-糖基化位点(Thr-37, 在基因型 A 中因不明原因此位点被 Asp 取代)^[17]. 考虑到 HBV 基因型 A 的感染性, 基本可以排除 Thr-37 位点 O-糖基化修饰对 HBV 感染的必要性, 但其他位点可能存在的 O-糖基化修饰在 HBV 进入过程中的作用尚未见文献报道.

2.2.3 SS 结构域. SS 结构域在三种表面蛋白中均存在, 其结构较复杂, 存在 N-糖基化和二硫键修饰. 有文献报道, 通过定点突变的方法考察了 N-糖基化修饰对 HDV 感染的重要性, 发现 N-糖基化修饰的缺失虽然会使 HDV 病毒颗粒分泌降低, 但对 HDV 的包装和体外感染并不必要^[18]. HBV 病毒颗粒表面的双层膜来源于细胞内膜(内质网膜和高尔基体膜)而非细胞膜, 因此, HBV 表面蛋白的 SS 结构域被二硫键高度交联, 使其在循环过程中

高度稳定,一般的去污剂均不能将其破坏,可以想象在 HBV 细胞侵入过程中如何打开这些二硫键将是 HBV 侵入成功与否的另一关键. 有证据显示,抗原环区(antigenic loop, AGL)即传统认为的抗原决定簇 a 区对 HBV 感染必不可少^[19],该区域二硫键较多,立体结构复杂,同时研究发现,巯基-二硫键互换抑制剂可剂量依赖地阻断 HDV 的感染^[20],因此 AGL 区可能参与了 HBV 的脱壳过程,当然也不能排除其有助于 HBV 的黏附和胞吞,具体何种作用尚待进一步研究. 另外,已有证据显示,SS 结构域的胞质 I 区(cytosolic domain I, CYL- I)和胞质 II 区(cytosolic domain II, CYL- II)对 HBV 感染并不必要^[21]. 三种表面蛋白均存在多个跨膜结构域,其中跨膜结构域 I 区(transmembrane domain I, TMD- I)在 HBV 感染进入过程中可能起到融合肽的作用,但尚需进一步的实验数据支持^[22~24]. SS 结构域 C 端构象比较复杂,研究结果不一致,可能具有两个或三个跨膜结构域,研究表明,该区域对 HDV 包装分泌必需的 Trp-196, Trp-199, Trp-201 突变为 Ala-196, Ala- 199, Ala-201, 并不影响

HBV 感染 HepRG 细胞^[25].

3 候选 HBV 进入相关分子的发现

自 HBV 发现确认以来,人们一直希望找到其感染靶细胞的受体分子或参与 HBV 感染的中介分子,多聚人血清蛋白(polymerized human serum albumin, pHSA)作为第一个候选分子在 20 世纪 80 年代得到了大量深入的研究,进入 20 世纪 90 年代,研究人员把目光转移到寻找其他候选受体分子上,其间发现大量与 HBV 表面蛋白互作的分子(图 4),但包括 pHSA 在内,这些候选受体分子在 HBV 的感染进入过程中的作用没有一个得到公认^[26]. 最近文献报道,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)对 HBV 感染第一步的细胞黏附起着关键性作用,但对 HBV 的侵入不具作用,遗憾的是 HSPGs 的表达分布并不具有种属和组织特异性,因此,其尚不能作为 HBV 感染侵入的受体分子,但可以认为是 HBV 感染的辅助受体分子^[27, 28].

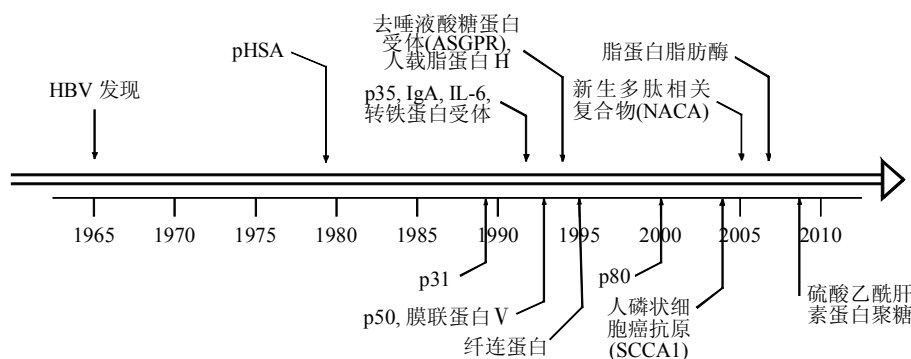


Fig. 4 Potential candidates involved in HBV entry

图 4 乙型肝炎病毒候选进入相关分子的发现

其他观点: a. 考虑到 PHH、PTH 或 HepRG 细胞的分化状态对 HBV 感染的必要性,以及未分化和已诱导分化的 HepRG 细胞对 HBV 的黏附特性无明显差别的特点,有学者怀疑相对于数量较少的受体分子(或者根本不存在)高分化肝细胞的极性状态对 HBV 的感染也许更重要^[26]; b. HBV 在感染 PHH 细胞前需要肝血窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)帮助活化——近来发现一个有趣的现象,虽然连续培养细胞系无法感染 HBV,但当 HBV 与 LSECs 细胞共孕育后获得了对 HepG2 细胞的感染性^[29, 30].

4 结语和展望

病毒的感染进入机制研究一直是国内外研究的热点,具体到 HBV 感染进入的机制虽然近年来取得了一系列进展,但还缺乏重大突破:因现有 HBV/HDV 感染模型的局限,HBV 表面蛋白一些结构域在 HBV 感染进入中的作用无法得到阐明;HBV 受体分子是否存在,如果存在,到底是什么,仍然是一个谜;HBV 脱壳的机制仍然几乎一无所知. 随着基于逆转录病毒包装系统的 HBV 假病毒感染体系的建立,HBV 表面蛋白一些关键结构域

在 HBV 感染进入中的作用未来可能得到阐明, HBV 感染最小表面蛋白结构域的揭示将为 HBV 受体寻找和新药发现提供有益的提示. HBV 现有治疗药物主要包括 α - 干扰素和核苷类抑制剂, 但 α - 干扰素存在应答率低、副作用明显的缺点, 核苷类药物的长期应用又往往会导致 HBV 耐药, 因此, 人们急于寻找靶向 HBV 生活周期其他步骤的新药物如阻断 HBV 的感染进入, HBV 受体的最终发现, 将为基于此机制的药物设计提供新的靶点, 从而加速 HBV 药物的研发. 因此, HBV 感染早期进入肝细胞机制研究仍将是未来 HBV 研究领域中最重要任务之一.

参 考 文 献

- Mabit H, Dubanchet S, Capel F, *et al.* *In vitro* infection of human hepatoma cells (HepG2) with hepatitis B virus (HBV): spontaneous selection of a stable HBV surface antigen-producing HepG2 cell line containing integrated HBV DNA sequences. *J Gen Virol*, 1994, **75** (Pt 10): 2681~2689
- Bchini R, Capel F, Daugeat C, *et al.* *In vitro* infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J Virol*, 1990, **64**(6): 3025~3032
- Gripon P, Rumin S, Urban S, *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (24): 15655~15660
- 庞其方, 万新邦, 胥爱源, 等. 乙型肝炎病毒(HBV)感染树鼯的实验研究(摘要). *医学研究通讯*, 1981, **9**: 11~12
Pang Q F, Wan X B, Xue E Y, *et al.* *Bull Med Res*, 1981, **9**: 11~12
- Walter E, Keist R, Niederost B, *et al.* Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, 1996, **24**(1): 1~5
- Kock J, Nassal M, MacNelly S, *et al.* Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol*, 2001, **75**(11): 5084~5089
- Blanchet M, Sureau C. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol*, 2007, **81**(11): 5841~5849
- Chai N, Chang H E, Nicolas E, *et al.* Assembly of hepatitis B virus envelope proteins onto a lentivirus pseudotype that infects primary human hepatocytes. *J Virol*, 2007, **81**(20): 10897~10904
- Schmitt S, Glebe D, Alving K, *et al.* Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *J Biol Chem*, 1999, **274**(17): 11945~11957
- Heermann K H, Goldmann U, Schwartz W, *et al.* Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*, 1984, **52**(2): 396~402
- Fernholz D, Galle P R, Stemler M, *et al.* Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology*, 1993, **194**(1): 137~148
- Gudima S, Meier A, Dunbrack R, *et al.* Two potentially important elements of the hepatitis B virus large envelope protein are dispensable for the infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*, 2007, **81**(8): 4343~4347
- Abou-Jaoude G, Molina S, Maurel P, *et al.* Myristoylation signal transfer from the large to the middle or the small HBV envelope protein leads to a loss of HDV particles infectivity. *Virology*, 2007, **365**(1): 204~209
- Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, *et al.* Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(17): 6730~6734
- Lepere C, Regeard M, Le Seyec J, *et al.* The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity. *J Virol*, 2007, **81**(14): 7816~7818
- Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, *et al.* Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol*, 1998, **72**(7): 5573~5578
- Schmitt S, Glebe D, Tolle T K, *et al.* Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol*, 2004, **85**(Pt 7): 2045~2053
- Sureau C, Fournier-Wirth C, Maurel P. Role of N glycosylation of hepatitis B virus envelope proteins in morphogenesis and infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*, 2003, **77**(9): 5519~5523
- Jaoude G A, Sureau C. Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*, 2005, **79**(16): 10460~10466
- Abou-Jaoude G, Sureau C. Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *J Virol*, 2007, **81**(23): 13057~13066
- Blanchet M, Sureau C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol*, 2006, **80**(24): 11935~11945
- Rodriguez-Crespo I, Nunez E, Gomez-Gutierrez J, *et al.* Phospholipid interactions of the putative fusion peptide of hepatitis B virus surface antigen S protein. *J Gen Virol*, 1995, **76**(Pt 2): 301~308
- Berting A, Fischer C, Schaefer S, *et al.* Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res*, 2000, **68**(1): 35~49
- Chojnacki J, Anderson D A, Grgacic E V. A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome. *J Virol*, 2005, **79**(23): 14945~14955
- Komla-Soukha I, Sureau C. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol*, 2006, **80** (10): 4648~4655
- Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 2007, **13**(1): 22~38
- Leistner C M, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol*, 2008, **10**(1): 122~133
- Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate

- proteoglycans. *Hepatology*, 2007, **46**(6): 1759~1768
- 29 Breiner K M, Schaller H, Knolle P A. Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology*, 2001, **34**(4 Pt 1): 803~808
- 30 Bruns M, Maenz C. Requirement of Activation for Hepatitis B Virus Infection. *Nature Precedings*, <http://hdl.handle.net/10101/npre.12007.10221.10101>

Recent Advances in Hepatitis B Virus Entry Research*

WANG Xue-Jun, WANG Sheng-Qi**

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract The mechanism of hepatitis B virus entry is an interesting area in HBV research but still enigmatic. The difficulties in HBV entry research were primarily caused by the lack of easily accessible *in vitro* infection models. Recent years, primary hepatocytes from *Tupaia belangeri* has been substituted for primary human hepatocytes and upon induction of differentiation *in vitro*. A human hepatoma cell line named HepaRG has been found to be susceptible for HBV infection too. The two cell models enabled researchers to obtain a number of important discoveries for HBV entry. This article are focusing on these discoveries, including the domains of HBV surface proteins involved in HBV entry, potential HBV receptor candidates and the questions to be resolved in future years.

Key words hepatitis B virus, entry, surface protein, domain, receptor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00630

*This work was supported by grants from The National Natural Science Key Program Foundation of China (30530650), National Basic Research Program of China (2005CB522902) and The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30625041).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: September 10, 2008 Accepted: October 24, 2008